

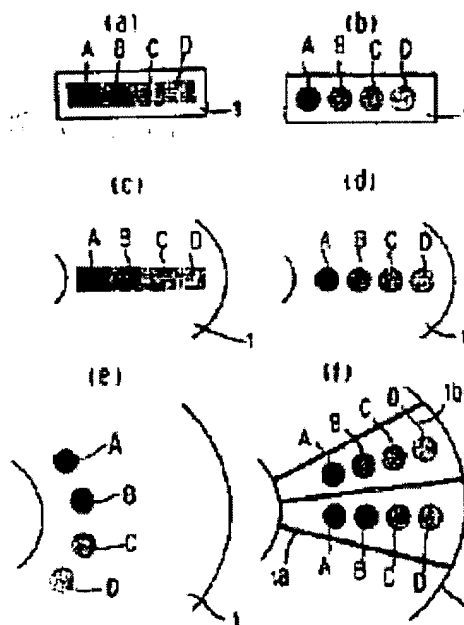
IMMUNOLOGICAL QUANTITATIVE ANALYSIS

Patent number: JP4233462
Publication date: 1992-08-21
Inventor: TAKASE MINORU; SHIBATA KAZUNORI
Applicant: IDEMITSU PETROCHEMICAL CO
Classification:
- **international:** G01N33/543
- **europaean:**
Application number: JP19900416991 19901228
Priority number(s): JP19900416991 19901228

Report a data error here

Abstract of JP4233462

PURPOSE: To achieve an expansion of measurable density area of an immunoassay, a reduction in the frequency of diluting operation of a sample to be inspected of the inspection and a higher measuring accuracy thereof. **CONSTITUTION:** Immobilizing areas are formed on a substrate for a plurality of antibodies and antigens different in density and the antigen or antibody in a sample is made to act on the substrate to trap the antigen or the antibody in the sample in the antibody or antigen immobilized in the areas. Then, a latex particle having the antibody or antigen immobilized thereon is made to work to trap the latex particle in the antigen or the antibody in the sample. Then, the number of the latex particles or a physical quantity correlated thereto is measured and a density value of the antigen corresponding to a measured value is determined from a calibration curve prepared previously using antigen with a known density.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-233462

(43) 公開日 平成4年(1992)8月21日

(51) Int. Cl.⁵

G 0 1 N 33/543

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

E 7906-2 J

審査請求 未請求 請求項の数6(全 8 頁)

(21) 出願番号

特願平2-416991

(22) 出願日

平成2年(1990)12月28日

(71) 出願人 000183657

出光石油化学株式会社

東京都千代田区丸の内3丁目1番1号

(72) 発明者 高瀬 貴

千葉県君津郡袖ヶ浦町上泉1660番地 出光石油化学株式会社内

(72) 発明者 柴田 和典

千葉県君津郡袖ヶ浦町上泉1660番地 出光石油化学株式会社内

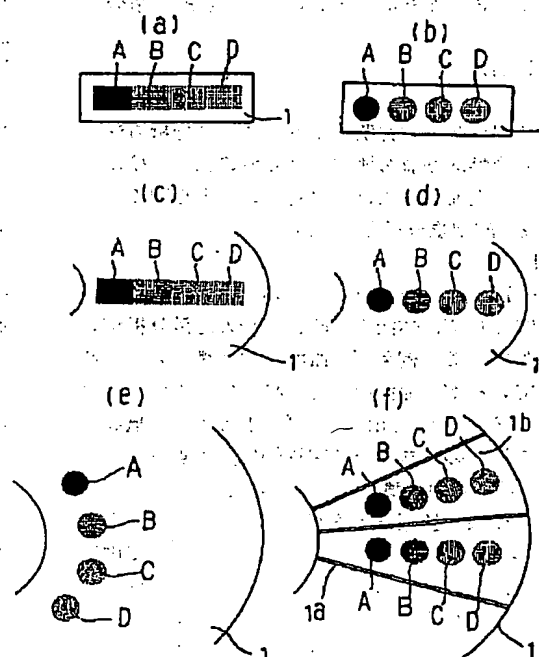
(74) 代理人 弁理士 渡辺 喜平 (外1名)

(54) 【発明の名称】 免疫学的定量分析方法

(57) 【要約】

【目的】 免疫学的検査の測定可能な濃度領域を拡大する。同検査における検体試料の希釈操作回数を減らす。同検査における測定精度を向上させる。

【構成】 基板上に濃度の異なる複数の抗体または抗原の固定領域を形成し、この基板に検体中の抗原または抗体を作用させ、各領域に固定された抗体または抗原に検体中の抗原または抗体を捕捉させる。次いで、抗体または抗原を固定してなるラテックス粒子を作用させ、前記検体中の抗原または抗体にラテックス粒子を捕捉せしめる。次に、ラテックス粒子数またはそれと相関する物理量を計測し濃度既知の抗原試料を用いてあらかじめ作成しておいた検量線から計測値に対応する抗原濃度を求める。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 固相上に測定可能な濃度領域が異なる複数の抗体固定領域を設け、この抗体固定領域に該抗体と特異的に反応する抗原を含む試料を作用させて抗原を抗原-抗体反応により捕捉せしめた後、さらに該抗原と特異的に反応する抗体を固定してなる不溶性担体粒子を作用させ、前記抗原によって捕捉された不溶性担体粒子の数または粒子数と相関する物理量を検出することにより試料中の抗原濃度を測定することを特徴とした免疫学的定量分析方法。

【請求項2】 固相上に測定可能な濃度領域が異なる複数の抗原の固定領域を設け、この抗原の固定領域に該抗原と特異的に反応する抗体を含む試料を作用させて抗体を抗原-抗体反応により捕捉せしめた後、さらに該抗体と特異的に反応する抗原を固定してなる不溶性担体粒子を作用させ、前記抗体によって捕捉された不溶性担体粒子の数または粒子数と相関する物理量を検出することにより試料中の抗体濃度を測定することを特徴とした免疫学的定量分析方法。

【請求項3】 濃度の異なる抗体、抗原の溶液を用いて固相上の各領域に抗原、抗体を固着せしめて、測定可能な濃度領域が異なる複数の抗原、抗体を固定した領域を固相上に形成することを特徴とした請求項1または2記載の免疫学的定量分析方法。

【請求項4】 固相が平板状の基板である請求項1、2または3記載の免疫学的定量分析方法。

【請求項5】 固相が回転可能な円盤状の基板である請求項1、2または3記載の免疫学的定量分析方法。

【請求項6】 不溶性担体粒子がラテックス粒子である請求項1、2、3、4または5記載の免疫学的定量分析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は免疫学的定量分析方法に関し、特に免疫学的検査の測定濃度領域の拡大、検体試料の希釈操作の簡略化および測定精度の向上を図ることのできる免疫学的定量分析方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、医療分野においては、病気の早期発見等を目的として、体液中の微量成分の定量分析が頻繁に行なわれている。例えば、血液中の微量成分の定量が行なわれているが、血液に含まれる体液成分はその濃度が ng (ナノグラム) / ml オーダーと極めて微量なものが多く、これらの微量成分を定量的に分析することは医療分野における重要な課題となっている。

【0003】 従来、抗原-抗体反応を利用した血液微量成分の免疫学的測定法としては、ラテックス凝集反応法 (LIA法)、ラジオイムノアッセイ法 (RIA法)、あるいは酵素免疫検査法 (EIA法) などの免疫学的手法が知られている。上記ラテックス凝集反応法 (LIA

法) は、1965年にSingerとPlotz らによって開発された方法であり、抗体 (または抗原) を固定してなる不溶性担体粒子 (ラテックス粒子) を用いて抗原-抗体反応を行なわせ、ラテックス粒子の凝集を生じさせた後、ラテックスの濁度から抗原 (または抗体) の濃度を求める方法である。また、ラジオイムノアッセイ法 (RIA法) は、放射性同位元素でラベルした抗体 (または抗原) を用いて抗原-抗体反応を行なわせ、抗体 (または抗原) にラベルした放射性同位元素の放射線量より抗原 (または抗体) の濃度を求める方法である。さらに、酵素免疫検査法 (EIA法) は、酵素でラベルした抗体 (または抗原) を用いて抗原-抗体反応を行なわせ、抗体 (または抗原) にラベルした酵素反応による発色の程度により抗原 (または抗体) の濃度を求める方法である。上記の各免疫学的測定方法においては、濃度既知の標準物質を用いて濁度、放射能強度、吸光度等を測定してあらかじめ検量線を作成しておき、未知濃度の検体を測定したときの測定値を検量線に当てはめ、それにより検体中の目的物質濃度を求めている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、上述した従来の免疫学的測定方法においては、作成される検量線はその性質上一本だけであり、この検量線による測定可能な濃度範囲は大きくても2~3桁の範囲しかないので、臨床検査等で扱っている種々の濃度の検体をすべてカバーすることはできない。したがって、未知濃度の検体の測定を行なう場合、検体を測定可能な濃度範囲になるまで何回も希釈する必要がある、この希釈操作が煩雑であり、時間面およびコスト面で不利であるという問題がある。さらに、希釈操作に伴うピペッティングの際に誤差の発生等が起き易いという問題がある。また、一般に S/N (信号/ノイズ) 比は測定回数の平方根に比例して向上することが知られているが、上述した従来の免疫学的測定法においては検量線が一本であるため、一回の測定においては単一のデータしか得ることができず、測定精度の向上に限界があるという問題がある。本発明は、上述した問題点にかんがみてなされたもので、免疫学的検査の測定可能な濃度領域の拡大、検体の希釈操作回数の低減および測定精度の向上を図ることのできる免疫学的定量分析方法の提供を目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】 上記目的を達成するために、本発明の免疫学的定量分析方法は、固相上に測定可能な濃度領域が異なる複数の抗体 (または抗原) の固定領域を設け、この抗体 (または抗原) 固定領域に該抗体 (または抗原) と特異的に反応する抗原 (または抗体) を含む試料を作用させて抗原 (または抗体) を抗原-抗体反応により捕捉せしめた後、さらに該抗原 (または抗体) と特異的に反応する抗体 (または抗原) を固定してなる不溶性担体粒子を作用させ、前記抗原 (または抗

体)によって捕捉された不溶性担体粒子の数またはこの粒子数と相関する物理量を測定することにより、抗原(または抗体)濃度を測定するようにしてある。また、好ましくは、濃度の異なる抗体、抗原の溶液を用いて固相上の各領域に抗原、抗体を固着せしめて、測定可能な濃度領域が異なる複数の抗原、抗体を固定した領域を固相上に形成するようにしてあり、不溶性担体粒子をラベリング粒子としてある。さらに、必要に応じ、固相として平板状の基板あるいは回転可能な円盤状の基板を用いた構成としてある。

【0006】ここで、抗原とは、免疫応答(抗体産生)や免疫寛容を誘導し(免疫原性)、または抗体と結合する活性を示す物質の総称をいう。抗体とは、ある抗原に対して免疫性を獲得した個体が持つ、抗原特異的に働く抵抗性の実態の総称をいう。

【0007】以下、本発明を図面を参照しつつ詳細に説明する。なお、ここでは基板/抗体/抗原/抗体/不溶性担体粒子の構成をとる場合について説明する。図1は本発明の免疫学的定量分析方法の手順を示す説明図である。本発明の免疫学的定量分析方法においては、まず、固相上に測定可能な濃度領域が異なる複数の抗体固定領域を設ける。ここで、固相としては抗体を固定しうるのであれば特に限定されないが、通常は基板が使用されている。例えば、図1(1)に示すように基板1上に抗体2が固定される。基板1に固定される抗体2は、測定しようとする抗原によって異なるが、例えば、測定しようとする抗原のある免疫動物(例えば、兎、山羊、羊など)に投与して産生させたポリクローナル抗体やモノクローナル抗体等が挙げられる。

【0008】ここで、基板1の大きさ、厚さ、形状等は適宜選択され、特に制限されないが、平板状(プレート状)あるいは回転可能な円盤状(ディスク状)とするのが好ましい。平板状の基板は、電子顕微鏡等を用いた分析に適する。また、基板を回転可能な円盤状に形成すると、試料の展開およびレーザー光等による分析が容易かつ自動的に行なえるので好ましい。基板1の形成材料としては、ポリカーボネート、ポリメチルメタクリレート、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリ酢酸ビニル、ポリウレタン、エポキシ樹脂等のプラスチック材料やガラス等の透明材料、あるいは光反射性の良い金属材料、その他シリコン単結晶のような無機材料等が挙げられる。このように基板を光透過性あるいは光反射性の良い材料で形成すると、レーザー光等による光学的分析が可能となる。上記固相(基板)上に測定可能な濃度領域が異なる複数の抗体固定領域を設けるには、例えば、濃度の異なる抗体溶液を用い、これを基板上に滴下し、物理吸着あるいは化学吸着によって固定する。滴下する抗体溶液の濃度はその抗体と特異的に反応する抗原(あるいは抗抗体)により異なるが、一般的には 10^{-8} ~ 10^{-1} g/mlオーダーの濃度のものが使用される。

【0009】抗体を固定させる具体的条件に関しては、一般的な抗体固定方法における条件と同様の条件が採用される(酸素免疫反応法、石川榮治著、医学書院刊1987年参照)。例えば、抗体の 0.05 M トリス緩衝食塩水(TBS)溶液(pH 8.2、抗体濃度 10^{-2} ~ 10^{-7} g/ml)あるいは 0.05 M 炭酸-重炭酸緩衝溶液(pH 9.6、抗体濃度 10^{-2} ~ 10^{-7} μg/ml)を基板上に滴下し、 20 ~ 30°C で2時間(あるいは 4°C で一昼夜)放置して、抗体2を基板1上に物理的に吸着せればよい。この場合、基板表面にアミノ基、カルボキシル基またはその誘導体等の官能基を有する基板を用いることにより、抗体を基板上に化学結合させることもできる。

【0010】上記複数の抗体固定領域の形状、配列に関しては種々の態様が可能である。例えば図2に示すように、各抗体固定領域A~Dの形状は円形(同図(b))、(d)、(e)または(f))、または矩形(同図(a))、(c))とされる。また、各抗体固定領域の配列としては、長方形の基板(プレート)1の長手方向に配列する場合(同図(a))、円形(同図(b))、円盤状の基板(ディスク)1の半径方向に配列する場合(同図(c))、円盤状のディスクの円周方向に配列する場合(同図(e))等が挙げられる。この場合、各領域A~Dは連続して配列してもよく(同図(a))、(c))、(e))、間隔をあけて配列してもよい(同図(b))、(d))、(f))。また、基板1は図2(f)に示すように、円盤状のディスクに多数の突条1aを放射状に形成して多数の試料展開面1bを設け、これら試料展開面1bのそれぞれに抗体固定領域A~Dを設けることにより、多数の検体試料の同時分析を行なえるようにしてもよい。

【0011】なお、抗体固定領域の数は図2に示したように四つの場合に限られず、任意の個数とできる。図2においては、各抗体固定領域A~Dの濃度は、領域A: 10^{-8} g/ml、領域B: 10^{-4} g/ml、領域C: 10^{-6} g/ml、領域D: 10^{-2} g/mlのように図示右方向あるいは下方向に向かって濃度が減少するように構成してあるが、その逆の順序になるように構成してもよい。

【0012】上記のように得られた複数の抗体固定領域A~Dを形成した基板は、図1(II)に示すように、非特異性吸着防止のため、ブロッッキング剤3でその表面を覆い、ブロッッキング処理を行なうことが好ましい。ここで、ブロッッキング剤としては、ウシ血清アルブミン、カゼイン、スキムミルク等が挙げられる。本発明方法においては、次に、上記抗体固定基板4上で、検体試料5中の抗原6を抗原-抗体反応により捕捉せしめる(図1(III))。ここで、分析対象とされる検体試料5としては、抗原を含むものであれば特に制限されない。例えば、血液、胸水、腹水、心臓水、関節水、尿等の体液を

5

挙げることができる。分析対象物である抗原は特に制限されないが、例えば、C-反応性蛋白質 (CRP)、 α -フエトプロティン (AFP)、癌胎児性抗原 (CEA) 等が挙げられる。ここで、CRPとはC-reactive proteinの略であって、炎症性疾患や体内組織の壊死があるような病態で著しく増量する血漿蛋白の一つであり、いわゆる急性相反応蛋白 acute phase proteinsの代表的な成分である。

【0013】基板1上で抗原-抗体反応を行なわせるには、例えば、基板1上の抗体固定領域A~Dの各々に分析対象物である抗原6を含んだ検体試料5を適量 (例えば50 μ l程度) 滴下すればよい。これによって、基板1上に形成された抗体固定領域A~D中の抗体2と検体試料5中の抗原6との間に抗原-抗体反応を行なわせることができる。また、円盤状の基板1を回転して、遠心力で検体試料を基板1上に薄膜状に展開することによって、基板1上で抗原-抗体反応を行なわせるようにしてもよい。この場合、抗原-抗体反応に要する時間は1~5分程度の短い時間で済む。抗原-抗体反応後、捕捉された抗原6以外の残余の成分7、8は、リン酸緩衝食塩水 (PBS) (pH7.4)、あるいはトリス緩衝食塩水 (TBS) (pH8.2) 等を適量 (例えば、1ml程度) 滴下して洗い流すか、あるいは滴下後さらに基板1を回転して洗い流す。

【0014】次いで、上記抗原-抗体反応後の基板1に、抗原6と特異的に反応する抗体9を固定してなる不溶性担体粒子10を作用させる (第1図 (IV))。ここで、抗体9を固定してなる不溶性担体粒子10とは、例えば、ラテックス粒子に、分析対象物である抗原6に対する抗体9を、物理的あるいは化学的に吸着または結合させて固定したものをいう。この場合、ラテックス粒子は粒径が揃っていればよく、プラスチック微粒子 (例えば、ポリスチレン等)、無機微粒子あるいは金属微粒子等のいずれであってもよい。不溶性担体粒子は、蛍光性を有するもの、あるいは着色されたものであってもよく、これにより蛍光性あるいは着色性を利用した分析が可能となる。この場合、不溶性担体粒子自体が蛍光物質で形成されていてもよく、蛍光材料でコーティングされていてもよく、蛍光物質が不溶性担体粒子に付着してもよい。抗体を固定してなる不溶性担体粒子を得るには、例えば、TBSを用いてpHや塩濃度を調整した1.0%ラテックス懸濁液に抗体を入れ、温室で2時間放置して、ラテックス粒子に抗体を物理吸着させる。その後、遠心分離にかけて上清を捨て、吸着されなかった抗体を除去し、沈殿部にリン酸緩衝食塩水 (PBS) (pH7.4) を注ぎ、再分散させて作成される (特開昭62-267298号, Applied and Environmental Microbiology, Oct. 1988, P2345-2348参照)。

【0015】上記のようにして調製された抗体を固定し

6

てなる不溶性担体粒子を含んだ水溶液は、上述した抗原-抗体反応後の基板1 (図1 (III)) に適量 (例えば、50 μ l) 滴下される (あるいは滴下後さらに基板1の回転によって展開される)。これにより、基板1の抗体2に捕捉された抗原6と、不溶性担体粒子10に固定された抗体9とが再度抗原-抗体反応を起こし、抗体9を介して不溶性担体粒子10が捕捉される (第1図 (IV))。基板1上に捕捉されなかった不溶性担体粒子は、上述した検体試料と同様の方法で洗い流される。このようにして、サンプル基板が作製される。

【0016】次に、上記サンプル基板1上の抗原6によって捕捉された不溶性担体粒子10の数または粒子数と相關する物理量を測定手段11で測定して、抗原6の数 (抗原の濃度) を求める (第1図 (IV))。ここで、粒子数等の測定手段11としては、光学的測定手段が好ましい。光学的測定手段としては、光学顕微鏡で得られる画像を画像解析装置を介して解析し粒子数の測定を行なう測定手段が例示される。また、他の光学的測定手段としては、レーザー、LED、ハロゲンランプ等の光源と、フォトディテクター、CCD (ラインセンサー含む) 等の受光系とを組み合わせた種々の測定手段が例示される。この場合、レーザー光等を用い反射率の変化等から直接粒子数を計数 (カウント) するようにしてもよく、あるいは着色による吸光度や蛍光物質による蛍光強度等のように粒子数と相關する物理量を測定し、これを粒子数に換算して粒子数を求めてもよい (特開平2-270900号参照)。

【0017】なお、光学的測定手段と不溶性担体粒子の粒径との関係については次のことがいえる。光学顕微鏡と画像解析装置とを組み合わせた測定手段を用いる場合には、不溶性担体粒子の粒径は0.2 μ m程度であることが好ましい。また、光学的測定手段としてレーザーを用いる場合には、不溶性担体粒子の粒径が小さくなるとレーザー光に対する信号が弱くなり、S/N比が悪くなるので好ましくない。一方、蛍光を発する不溶性担体粒子を用いる場合には、蛍光強度を粒子数に換算して、抗原濃度を測定しているので、粒径が小さくてもよい。さらに電子顕微鏡を用いれば0.2 μ m以下の不溶性担体粒子も利用することができる。上記の観点および抗原-抗体の反応性からすると、不溶性担体粒子の粒径は0.01~10 μ mの範囲内であることが好ましい。

【0018】上記で計測した不溶性担体粒子の個数から抗原の濃度を求めるには、抗原濃度既知の試料を用いること以外は上述したのと同様にして、抗原濃度と不溶性担体粒子の数との関係を求め、あらかじめ検量線を作成しておき、この検量線から、抗原濃度を求めればよい。この場合、検量線は、測定可能な濃度領域が異なる抗体固定領域A~Dごとに作成される (したがって検量線は四本作成される)。例えば、抗原濃度既知の試料であって抗原濃度が異なるものを6種 (10⁻⁸~10⁻¹ g/

m1) 用意し、この抗原濃度既知の6種のそれぞれを各抗体固定領域A~Dに作用させ、上述したと同様にし、不溶性担体粒子の数を測定して、各抗体固定領域A~Dにおける抗原濃度と担体粒子の数との関係を求める。そして、これらの関係を一つのグラフにプロットして検量線A'~D'を作成する(図3(a)参照)。

【0019】次に、図3(a)に示す検量線から未知濃度(Ca)の抗原濃度を求める方法を具体的に説明する。例えば、未知濃度(Ca)の検体試料を各抗体固定領域A~Dに作用させたとき、抗体固定領域A~Cにおいてラテックス数a1, a2, a3が計測されたとすると(Dでは検量線D'の範囲外であるので計測されない)図3(a)の各抗体固定領域についての検量線A'~C'により、そのラテックス数に対応する濃度Ca1, Ca2, Ca3が求められる。そして、それらの平均値Caが抗原濃度とされる(図3(b)参照)。同様に、抗原濃度を未知濃度(Cb)とし、各濃度領域A~Dにおけるラテックス数がb1(領域A)、b2(領域B)、b3(領域C)、b4(領域D)(A、B領域ではラテックス数が多すぎて有効測定領域外でありラテックス数は得られない)であるとする(図3(a)の検量線C', D'より濃度Cb1, Cb2が求められる。そしてそれらの平均値Cbが抗原濃度とされる(図3(c)参照)。

【0020】図3(a)に示されたごとく固定抗体の濃度差によって検量線A'~D'の位置が違うので、一つの検量線ではカバーできなかったダイナミックレンジが見掛け上拡大した形になる。これにより、従来行なっていた測定可能範囲になるまでの稀釈の繰り返し操作が省略又は低減される。また、もし抗原濃度が図3(a)に示すCaの場合には、A, B, Cエリアで捕捉されたラテックス数より各々濃度が求められる(図3(b))。この場合、その値が予め決定されている測定可能領域内にある測定値のみを有効測定値とし、それらを平均することにより目的物質濃度が求められる(図3(b))。これにより従来の検量線一つだけによるものより測定精度の向上が期待できる。一般に、S/N(信号/ノイズ)比は測定回数の平方根に比例することが知られているからである。

【0021】なお、上述した本発明の免疫学的定量分析方法においては、説明の都合上、基板/抗体/抗原/抗体/不溶性担体粒子の構成となる場合を示したが、かわりに、基板/抗原/抗体/抗原/不溶性担体粒子の構成とし、抗体濃度の定量を行なうものとしてもよい。

【0022】

【実施例】以下、実施例にもとづき本発明をさらに詳細

に説明する。

【実施例1】CRP(C-反応性蛋白質)の定量 抗体固定基板の作成

図2(b)に示すように、タテ2cm、ヨコ7cmのポリカーボネート製プレート上に、CRP抗原を免に免疫させて得たCRP抗体を固定させる。抗体の固定には、抗体濃度 1×10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} g/mlのTBS(トリス緩衝食塩水)溶液50 μ lを、1cm ϕ 径の面積となるようにそれぞれ上記の順番で領域A~Dに滴下し、30℃で2時間静置して物理吸着させた。

その後、吸着されなかった抗体をTBS(pH8, 2)10mlで洗浄し、さらに非特異吸着の防止のため、ブロッキング剤(ブロックエーズ(雪印製)を用い4℃で一晩静置してブロッキング処理を行なった。Tween 20(ポリサイエンス社製)0.05wt%を加えたトリス緩衝食塩水(以下TBS-Tweenという)1.0mlで残ったブロッキング剤を洗浄し、抗体固定基板とされた。

【0023】検量線の作成

CRP抗原濃度既知のTBS溶液標準液(例えば 1.0×10^{-3} 、 1.0×10^{-4} 、 1.0×10^{-5} 、 1.0×10^{-6} g/ml)50 μ lを基板上の抗体固定領域A~Dを全て覆うように広げた。30℃で5分間静置し、抗原-抗体反応を行なわせた後、上記TBS-Tween 10mlで未反応の抗原溶液を洗浄した。予めCRP抗体を物理吸着により感作(固定)した0.1 μ m ϕ のポリスチレンラテックス粒子をTBSに分散させた分散溶液(ラテックス濃度:0.05wt%)50 μ lを、上記抗原溶液と同様にし領域A~Dに広げた。30℃で5分間静置し、抗原-抗体反応によりラテックス粒子を捕捉させた後、上記TBS-Tween 10mlにより未反応のラテックス溶液を洗浄した。各領域(A~D)におけるラテックス粒子数を画像解析装置を接続した日立製電子顕微鏡S-800でカウントし、各抗体固定領域(A~D)の抗原(濃度 1.0×10^{-3} g/ml)に対するラテックス数とした。同様に 1.0×10^{-4} 、 1.0×10^{-5} 、 1.0×10^{-6} 、 1.0×10^{-7} 、 1.0×10^{-8} 、 1.0×10^{-9} g/mlのCRP抗原濃度既知のTBS標準溶液にて上記のごとくラテックス粒子数をカウントし、各領域A~Dの各抗原濃度に対するラテックス数とした。上記各領域A~Dの各抗原濃度に対するラテックス数は、表1に示す通りになった。これらの関係を1つのグラフにプロットしたのが図4である。これをCRP抗原定量における検量線とした。

【0024】

【表1】

各抗体固定領域における抗原濃度とラテックス粒子数の関係

領 域 (名)	抗体濃度 (g/ml)	抗 原 濃 度 (g/ml)					
		1.0×10^{-11}	1.0×10^{-9}	1.0×10^{-7}	1.0×10^{-5}	1.0×10^{-4}	1.0×10^{-3}
		ラ テ ッ ク ス 数 (個/100 μm^2)					
A	1.0×10^{-3}	●340	420	1100	1870	—	—
B	1.0×10^{-4}	■—	330	780	1420	1780	1970
C	1.0×10^{-5}	▲—	—	410	940	1390	1580
D	1.0×10^{-6}	◆—	—	—	570	930	1250

【0025】未知試料中のCRP濃度の定量

表2に示したように、被検者から採血した血液を常法（遠心分離法）で血清分離し、検体1、2、3とした。上記検体1をTBSにより5倍希釈した溶液50 μ lを、上記検量線作成法と同様に、基板上の抗体固定領域A～D上に広げた。30℃で5分間静置、反応させた後、未反応の検体溶液はTBS10mlにより洗浄、除去した。CRP抗体感作ラテックス分散溶液（0.05wt%/TBS溶液）50 μ lを領域A～Dに広げて、30℃で5分間静置、反応させた。抗原抗体反応により捕捉されなかったラテックス溶液を、TBS-Tween10mlで洗浄、除去した。各エリアにおけるラテックス粒子数を電子顕微鏡観察によりカウントし、各エリアの検量線から検体1の濃度を540（A）ng/m

l、538（B）ng/ml、534（C）ng/mlとした。なお、Dエリアより得たラテックス数は測定可能領域外であり、これを無視した。次いで、これらの濃度の算術平均をとり、540ng/mlを検体1のCRP濃度とした。以下検体2、3も同様にして、それぞれ24.8 μ g/ml、3.5ng/mlのCRP濃度を得た。この結果を表2に示す。

【比較例1】従来法（LIA法）で同検体1～3を測定した。この結果、検体1のCRP濃度は538ng/ml、検体2のCRP濃度は24 μ g/mlであり、検体3のCRP濃度は測定不能であった。この結果を表2に示す。

【0026】

【表2】

未知試料中のCRP濃度

検体番号	領域名	実 施 例		比 較 例	
		本 発 明 法		従来(LIA)法 ²⁾	
		実 測 値	平 均 値 ¹⁾	CRP ²⁾	CRP-H
1	A	540 ng/ml	540 ng/ml	—	538 ng/ml
	B	538 ng/ml			
	C	543 ng/ml			
2	A	24 µg/ml	24.8 µg/ml	24 µg/ml	—
	B	24 µg/ml			
	C	26 µg/ml			
	D	25 µg/ml			
3	A	3 ng/ml	3.5 ng/ml	測定不能	測定不能
	B	4 ng/ml			

1) 平均値をもって未知検体のCRP抗原濃度とした。

2) ダイアトロン LPIA-100を使用した。

3) LPIA-100用キットとして

CRP: 0.2~11 ng/dl 測定可能を使用した。

CRP-H: 2~500 µg/dl 測定可能を使用した。

【0027】上述した本発明の免疫学的定量分析方法によれば、測定可能な濃度領域が異なる複数の抗体固定領域を設けているので、各領域の各検量線が重なり合っ
て、見掛け上のダイナミックレンジ（測定可能域）が拡大し（個々の領域については、ダイナミックレンジが拡大しているわけではない）、実際上の測定可能な濃度領域が拡大する。したがって、煩雑な希釈操作を省略し、
あるいは希釈回数を減らすことができ、これによって、
検査時間の短縮および検査のコストダウンが図られる。
また、一回の検体測定によって、複数のデータ（検出濃度）が得られるため、検出精度が向上する。

【0028】

【発明の効果】以上説明したように、本発明の免疫学的定量分析方法によれば、免疫学的検査の測定可能な濃度領域の拡大、希釈操作回数の低減および測定精度の向上を図ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の免疫学的定量分析方法の手順を示す説明図である。（I）～（IV）は各手順を示す。

【図2】抗体固定領域の態様を示す平面図である。

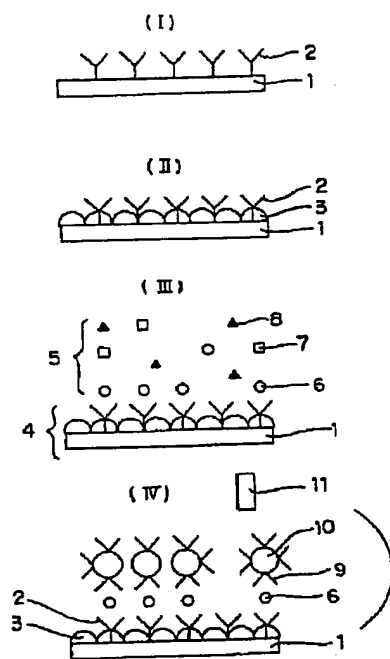
【図3】（a）は検量線を示すグラフ、（b）、（c）は未知濃度の検体試料から抗原濃度を求める例を示した説明図である。

【図4】実施例において作成した検量線を示すグラフである。

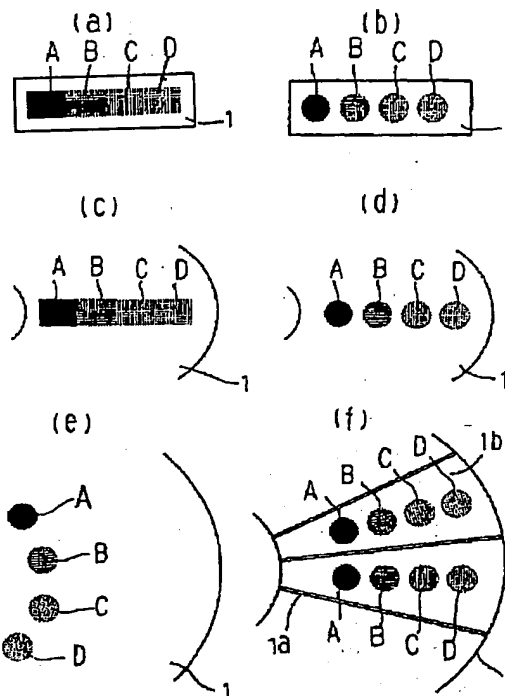
【符号の説明】

- 1…基板
- 2…抗体
- 3…ブロッキング剤
- 5…検体試料
- 6…抗原
- 9…抗体
- 10…ラテックス粒子
- 11…測定手段

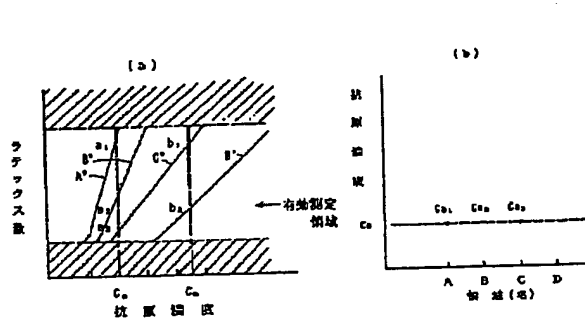
【図1】



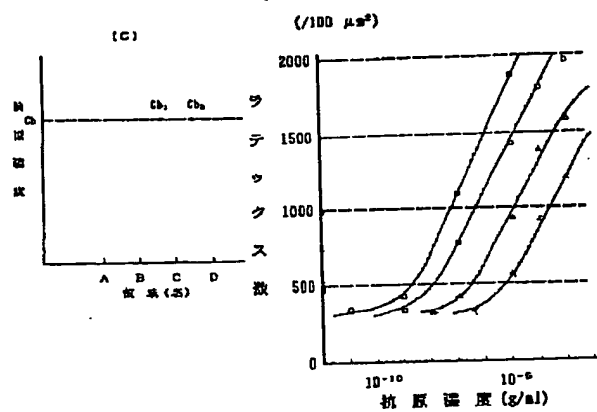
【図2】



【図3】



【図4】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)